

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

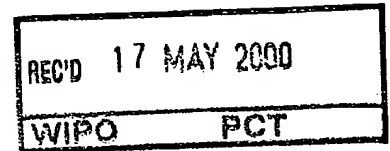
THIS PAGE BLANK (USPTO)

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

EP 00 / 1497

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

4

**Bescheinigung**

Die Herren Michael H o f f m a n n und Roland H o r r e s , beide in Stolberg/Deutschland,
haben eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Hämokompatible Oberflächen und Verfahren zu deren
Herstellung"

am 26. Februar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüngli-
chen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol
A 61 L 33/00 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 3. April 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Joost".

Aktenzeichen: 199 08 318.5

Joost

Hämokompatible Oberflächen und Verfahren zu deren Herstellung

Die vorliegende Erfindung betrifft hämokompatible Oberflächen, die sich dadurch auszeichnen, daß auf/in die Oberfläche von Werkstoffen Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen, Mesothelzellen und/oder mesothelzellreichem Gewebe auf- bzw. eingebracht sind. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung hämokompatibler Oberflächen sowie deren Verwendung in weiten Bereichen des Gesundheitssektors, in der Medizin, Zahnmedizin, Chirurgie, Kosmetik und/oder in Bereichen, die direkt mit Blut, Gewebe und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Kontakt stehen.

Die Blutgerinnung stellt sich bei Vertebraten als ein komplexer Prozeß dar, der im Falle einer Verletzung kurzfristig vor lebensbedrohlichen Blutverlusten schützt. Aktiviert wird das Blutgerinnungssystem dabei u.a. durch den Kontakt mit unphysiologischen, also „fremden“ Substanzen. Substanzen, die das Blutgerinnungssystem aktiv unterdrücken werden auch als anti-thrombogen bezeichnet. Hingegen werden Substanzen, die das Blutgerinnungssystem nicht aktivieren als nicht-thrombogen definiert.

Die Aktivierung des Blutgerinnungssystems stellt vor allem bei Menschen, die auf Implantate, wie beispielsweise Intracoronarstents, Herzschrittmacher, Prothesen, künstliche Gefäße, chirurgische Nahtmaterialien, Katheter, Biosensoren u.a. angewiesen sind, ein schwerwiegendes Problem dar. Hier wird zur Vermeidung der Ausbildung lebensbedrohlicher Gefäßverschlüsse (Thromben) das Blutgerinnungssystem außer Kraft gesetzt bzw. aktiv unterdrückt. Dies erfolgt in der Regel durch die Gabe von anti-thrombogenen Medikamenten, sogenannten Antikoagulantien. Diese wiederum weisen eine Vielzahl starker Nebenwirkungen für den Patienten auf, wie beispielsweise Thrombozytopenie, Nausea, Erbrechen, Haarausfall, hämorrhagische Hautnekrosen, erhöhte Blutungsneigung etc.. Darüber hinaus ist im Falle der Verwendung von Intracoronarstents selbst die vollständige medikamentöse Unterdrückung der Blutgerinnung oftmals kein ausreichender Schutz vor der Ausbildung zum Teil tödlich wirkender Thrombosen.

Für weite Bereiche des Gesundheitssektors, der Medizin, Zahnmedizin, Chirurgie, Kosmetik oder Bereiche, die direkt mit Blut, Gewebe und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Kontakt stehen, ist daher die Vermeidung der zuvor genannten starken Nebenwirkungen durch Antikoagulantien von großer Bedeutung.

Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Verfahren bekannt, die unphysiologische „Fremdoberflächen“ durch Beschichtung mit unterschiedlichen Substanzen blut- bzw. gewebeverträglicher (hämkompatibel) machen sollen.

So beschreibt die Patentschrift DE 28 31 360 ein Verfahren zur Beschichtung einer Oberfläche eines medizinischen Gegenstandes mit einer Substanz, die das Gerinnungssystem aktiv unterdrückt, also anti-thrombogen ist, wie beispielsweise Heparin. Jedoch weist auch diese Substanz den Nachteil erheblicher Nebenwirkungen auf. Ferner wird nur eine kurz- bis mittelfristige Unterdrückung des Gerinnungssystems erreicht, da die aktiven Substanzen entweder deaktiviert oder bei Release-Systemen verbraucht werden.

In der Offenlegungsschrift DE 44 35 653 werden Materialien mit einer dünnen Lackschicht aus Polymeren, in die zusätzlich Arzneistoffe eingearbeitet sein können, beschichtet, wobei diese Lackschicht im Körper permanent degradiert und somit freigesetzt wird. Nachteile dieser Methode sind zum einen, daß durch den permanenten Zerfall der Beschichtung nur eine zeitlich begrenzte Wirkung möglich ist. Zum anderen ist durch die permanente Ablösung von Lackpartikeln die Gefahr der Ausbildung von Thrombosen, die zu Embolien führen können, sehr hoch.

Die Offenlegungsschrift DE 196 30 879 verwendet zur Beschichtung von Substraten ausschließlich chemisch modifizierte Derivate von Polysacchariden. Die Nachteile dieses Verfahrens sind dabei vielgestaltig und reichen von einem übermäßigen präparativen Aufwand über vielstufige Syntheseschritte, einem breiten Spektrum an unerwünschten Nebenreaktionen und mangelhaften Ausbeuten bis hinzu durchweg schlechteren Eigenschaften der Derivate verglichen mit kommerziell erhältlichen anti-thrombogenen Substanzen, wie beispielsweise Heparin.

Aus der Patentschrift DE 36 39 561 ist die Herstellung von Substraten, die mit dem spezifischen Endothelzelloberflächen-Proteopolysaccharid HS-I beschichtet werden, bekannt. Nachteile dieses Verfahrens sind zum einen die zeit- und kostenintensive Kultivierung der Endothelzellen und zum anderen die aufwendige Präparation des Proteopolysaccharid HS-I. Aufgrund dessen ist eine großtechnische Herstellung von HS-I und somit eine vertretbare wirtschaftliche Nutzung dieses Verfahrens zur Beschichtung von Implantaten nicht realisierbar.

Verhagen et al. (British Journal of Haematology, 1996, 95: 542-549) beschreibt die Verwendung von ganzen Zellen des Endothels bzw. Mesothels zur Besiedlung von Implantaten. Nachteilig an der Verwendung ganzer Zellen ist hier, daß es aufgrund spezifischer Zelloberflächenproteine zu Immunreaktionen kommt, die bei den Patienten zu Abstoßungsreaktionen gegenüber den beschichteten Implantaten führen. Substanzen, die eine solche Immunreaktion auslösen, werden auch als immunogen bezeichnet. Zur Vermeidung einer Abstoßung durch Immunreaktionen muß bei diesem Verfahren ausschließlich patienteneigenes Zellmaterial benutzt werden. Dies stellt einen weiteren Nachteil dar, da die Anzucht dieser Zellen sehr zeit- und kostenintensiv ist. Problematisch sind bei der Verwendung von ganzen Zellen ferner die hohen Scheerkräfte, denen diese Zellen im Blutstrom ausgesetzt sind. Dies führt zu verstärkter Degradation der Zellen an den Oberflächen, was sich negativ auf die Haltbarkeit der beschichteten Implantate auswirkt.

Die hier vorliegende Erfindung hat sich demgemäß die Aufgabe gestellt, blut- bzw. gewebeverträgliche, also hämokompatible Oberflächen zur Verfügung zu stellen, die die zuvor genannten Nachteile nicht aufweisen und gleichzeitig für den Einsatz im großtechnischen Maßstab geeignet sind.

Diese Aufgabe wird überraschender Weise durch hämokompatible Oberflächen gelöst, die sich dadurch auszeichnen, daß auf/in die Oberfläche von Werkstoffen Bestandteile der äußeren Schicht (Glykokalix) von Blutzellen, Mesothelzellen und/oder mesothelzellreichem Gewebe auf- bzw. eingebracht sind.

Die erfindungsgemäßen hämokompatiblen Oberflächen ahmen im wesentlichen die natürliche Oberfläche nicht-thromogener Zellen bzw. Gewebe nach. Erfindungsgemäß zeichnen sie sich dadurch aus, daß sie auch langfristig nicht-thrombogen sind. Das heißt, die erfindungsgemäßen hämokompatiblen Oberflächen unterdrücken die Blutgerinnung nicht aktiv, lösen aber auch keine ungewünschte Thrombenbildung aus. Folglich kann die Blutgerinnung bei Verletzungen ganz natürlich und ungestört ablaufen.

Ferner bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf die Beschichtung von Werkstoffoberflächen mit Glykoproteinen, bevorzugt Glykophorinen, besonders bevorzugt Glykophorin A. Durch Glykophorin A der äußeren Schicht von Erythrocyten ist u.a. die Blutgruppenzugehörigkeit eines Menschen festgelegt. Gleichzeitig zeichnet sich Glykophorin A durch nicht-thrombogene Eigenschaften aus und ist somit hervorragend für die Herstellung der erfindungsgemäßen hämokompatiblen Oberflächen geeignet. Eine mögliche Immunantwort, beispielsweise ein Verklumpen von Blut (Koagulation) durch Kreuzreaktionen nicht miteinander verträglicher Blutgruppen, kann hier auf einfache Weise durch die Abstimmung der Blutgruppe des Patienten mit der Blutgruppenzugehörigkeit der auf/in die Oberfläche von Werkstoffen auf- bzw. eingebrachten Glykophorine ausgeschlossen werden.

Erfindungsgemäß kommen auch Oligo- bzw. Polysaccharid- und/oder Lipidanteile der äußeren Schicht nicht-thrombogener Zellen zum Einsatz. Aufgrund dessen zeichnen sich die erfindungsgemäßen hämokompatiblen Oberflächen dadurch aus, daß sie nicht-immunogen sind. Das heißt, sie lösen bei den Patienten keine Immunreaktion aus, wodurch eine Abstoßungsgefahr durch Immunantwort auszuschließen ist. Ein weiterer Vorteil ist, daß die erfindungsgemäßen hämokompatiblen Oberflächen universell einsetzbar sind, d.h. nicht individuell für jeden Patienten eigens in zeit- und kostenaufwendigen Verfahren, wie z. B. über Zellkulturen, hergestellt werden müssen.

Darüber hinaus sind die erfindungsgemäßen hämokompatiblen Oberflächen frei von Nebenwirkungen. Zusätzlich findet aufgrund der erfindungsgemäßen festen Verankerung der nicht-thrombogenen Bestandteile der äußeren Zellschicht auf den

Werkstoffen nahezu keine Degradation an den Oberflächen statt. Eine Gefahr der Bildung von Embolien durch Thrombosen besteht somit nicht.

Erfindungsgemäß enthalten die hämokompatiblen Oberflächen bevorzugt Oligo- bzw. Polysaccharid- und/oder Lipid-Anteile der Glykoproteine, Glykolipide oder Proteoglykane der äußeren Schicht von Blutzellen, Mesothelzellen und/oder mesothelzellreichem Gewebe.

Besonders bevorzugt enthalten die erfindungsgemäßen hämokompatiblen Oberflächen als Glykoproteine Glykophorine, ganz besonders bevorzugt Glykophorin A, als Glykolipide Glykosphingolipide und/oder als Oligo- bzw. Polysaccharid-Anteile der Proteoglykane Hyaluronsäuren, Chondroitinsulfate, Dermatansulfate, Heparansulfate, Keratansulfate oder Mischungen davon.

Höchst bevorzugt enthalten die erfindungsgemäßen hämokompatiblen Oberflächen Heparansulfat der Erythrocyten-Plasmamembran tierischer und/oder menschlicher Herkunft.

Als Werkstoffe der erfindungsgemäßen hämokompatiblen Oberflächen eignen sich bevorzugt künstliche oder natürliche Polymere oder Mischungen davon (sogenannte Polymerblends), makromolekulare Substanzen, anorganische Substrate und/oder Materialien, die mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten in Verbindung kommen, oder Kombinationen davon.

Als anorganische Substrate enthalten die erfindungsgemäßen hämokompatiblen Oberflächen besonders bevorzugt Metalle, Metalloxide, Legierungen, Keramiken, Gläser, Mineralien oder Mischungen davon.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist außerdem ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen hämokompatiblen Oberflächen, bei dem als Bestandteile die Oligo- bzw. Polysaccharid- und/oder Lipid-Anteile der Glykoproteine, Glykolipide oder Proteoglykane der äußeren Zellschicht (Glykokalix) von Blutzellen, Mesothelzellen, und/oder mesothelzellreichem Gewebe isoliert und auf/in die Oberfläche von Werkstoffen auf- bzw. eingebracht werden.

Erfindungswesentlich ist ferner, daß als Ausgangsmaterialien zur Gewinnung der Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen Vollblut oder die aus Vollblut gewonnenen Zellfraktionen menschlicher oder tierischer Herkunft verwendet werden. Als Zellfraktionen werden dabei erfindungsgemäß bevorzugt Erythrocyten, Leukocyten oder Thrombocyten verwendet, wobei die Verwendung von Erythrocyten besonders bevorzugt wird. Zur erfindungsgemäßen Isolierung von Bestandteilen der äußeren Schicht von Mesothelzellen oder mesothelzellreichem Gewebe werden bevorzugt Omentum, Peritoneum oder innere Organe verwendet.

Eine preiswerte und leicht zugängliche Quelle für diese Ausgangsmaterialien kann beispielsweise Blut oder mesothelzellreiches Gewebe aus Schlachtabfällen sein.

Die Isolierung der Bestandteile der äußeren Schicht der Blutzellen, Mesothelzellen oder des mesothelzellreichen Gewebes erfolgt dabei in an sich bekannter Weise. Beispielsweise sind hier folgende Verfahren oder deren Kombinationen denkbar: Zerkleinerung, Extraktion, Filtration, Fällung, Gelfiltration, Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie, Elektrophorese, enzymatische oder chemische Abbauten, Trocknung, Auflösung, Dialyse, Ultrafiltration etc..

Ferner zeichnet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung hämokompatibler Oberflächen dadurch aus, daß die Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen, Mesothelzellen und/oder mesothelzellreichem Gewebe chemisch oder physikalisch auf/in die Oberfläche von Werkstoffen auf- bzw. eingebracht werden.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird zur Auf- bzw. Einbringung der Bestandteile der äußeren Zellschicht auf/in die Oberfläche von Werkstoffen eine Immobilisierung, Photoimmobilisierung, Kupplung, Adhäsion, Trocknung oder eine Kombination davon durchgeführt. Dabei können kovalente, ionische, nebenvalente bzw. elektrostatische oder adhäsive Bindungen oder Kombinationen davon zwischen den Bestandteilen der äußeren Schicht der Zellen und den Oberflächen der Werkstoffe ausgebildet werden. Bevorzugt erfolgt die Auf- bzw. Einbringung der Bestandteile der äußeren Zellschicht auf/in die Oberfläche von Werkstoffen durch kovalente Bindungen.

Die vorliegende Erfindung schafft durch ein zeit- und kostengünstiges Verfahren die Voraussetzungen zur Herstellung hämokompatibler Oberflächen im großtechnischen Maßstab, verbunden mit einem breiten Spektrum wirtschaftlicher Anwendungsmöglichkeiten.

Als Einsatzbereich der erfindungsgemäßen hämokompatiblen Oberflächen sind weite Bereiche des Gesundheitssektors, der Medizin, Zahnmedizin, Chirurgie oder Kosmetik und/oder Bereiche, die mit Blut, Gewebe und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Verbindung kommen, denkbar.

Im folgenden wird die Erfindung unter Bezugnahme auf die Beispiele näher erläutert:

Isolierung von Erythrocytenplasmamembran Heparansulfat:

Ein Liter serumfrei gewaschene Erythrocyten werden in 1 Liter 0,154 molarem Phosphatpuffer pH 7 suspendiert und mit 1 U/ml Papain versetzt. Nach 2 Stunden Inkubation bei 56°C wird 20 Minuten bei 3000 g abzentrifugiert und der Überstand anschließend dekantiert. In diesem Überstand werden 100 ml DEAE-Sepharose CL-6B Ionenaustauscher-Gel der Firma Pharmacia Biotech suspendiert. Das so beladene Gel wird noch dreimal in 0,1 molarer Kochsalz-Lösung gewaschen und in eine Chromatographiesäule gefüllt. Die Elution erfolgt mittels eines linearen Kochsalzgradienten im Bereich von 0,1 bis 0,8 mol/l über einem Gesamtvolumen von 2 Litern. Es werden 200 Fraktionen zu je 10 ml Volumen gesammelt. Die Fraktionen, die mit Dimethylmethylenblau (DMMB) der Firma Fluka nach der Methode beschrieben bei Chandrasekhar et al (Analytical Biochemistry, 161 (1987): 103-108) eine positive Farbreaktion ergeben, werden vereinigt. Die Lösung der gesammelten Fraktionen wird bei 26,7 hPa (20 Torr) und 40°C eingeeengt und gegen Wasser dialysiert. Das Dialysat wird auf ein Volumen von 100 ml und eine Konzentration von 0,03 mol/l Natriumacetat, 0,073 mol/l Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan der Firma Fluka) und pH 8.0 eingestellt, mit 1 U Chondroitinase ABC versetzt und 15 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Dialysieren gegen Wasser und Einengen unter Wasserstrahlvakuum wird die erhaltene Lösung erneut auf eine Säule mit 100 ml DEAE-Sepharose CL-6B der Firma Pharmacia

Biotech. aufgetragen und wie zuvor beschrieben eluiert. Die DMMB-positiven Gradientenfractionen werden dialysiert, unter Wasserstrahlvakuum auf ein Volumen von 1 ml eingengt und auf einer Säule zur präparativen Gelfiltration (60 cm x 2 cm) unter Verwendung eines Sephacryl S-300 Gels (Pharmacia Biotech.) chromatographiert. Es werden 60 Fraktionen zu je 2 ml Volumen gesammelt, mit DMMB detektiert und die positiven Fraktionen vereinigt. Nach wiederholter Dialyse und Lyophilisation erhält man das aufgereinigte Erythrocytenplasmamembran-Heparansulfat.

2.) Isolierung von Leukocytenoberflächen-Proteochondroitinsulfat:

Ein Liter Citratblut wird 10 min in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor bei 3000 g zentrifugiert und das überstehende Plasma abgesaugt. Das Zellsediment wird mit 2 Litern auf 4°C gekühlter 1%iger Ammoniumoxalatlösung gemischt und 30 min bei derselben Temperatur inkubiert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 500 g wird der rote Überstand verworfen und das Pellet in 2 Litern auf 4°C gekühlter 1%iger Ammoniumoxalatlösung suspendiert, 5 min bei 500 g zentrifugiert und der Waschvorgang, wie oben beschrieben noch zweimal wiederholt. Der nun farblose Überstand wird verworfen und das gewaschene Zellsediment (Ausbeute: 12×10^7 - 10×10^9 Zellen in 2 Litern Triton X-100 Puffer (0,5% Triton X-100, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8) unter ständigem Rühren bei 25°C über 2 Stunden lysiert. Der Detergenzextrakt wird 60 min bei 10.000 g zentrifugiert, dekantiert und im Überstand werden im 10 ml DEAE Sephadex A50 Ionenaustauscher Gel der Firma Pharmacia Biotech. suspendiert und sedimentiert. Das so beladene Gel wird noch dreimal in 0,1 molarer Kochsalz-Lösung gewaschen und in eine Chromatographiesäule gefüllt. Mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0,1 bis 0,8 mol/l über ein Gesamt-Elutionvolumen von 2 Litern wird die Säule eluiert. Es werden 100 Fraktionen zu je 2 ml Volumen gesammelt und die Fraktionen, die mit Dimethylmethylenblau (DMMB der Firma Fluka) eine positive Farbreaktion ergeben, vereinigt. Die Lösung wird bei 26,7 hPa (20 Torr) und 40°C eingengt und gegen Wasser dialysiert. Das Dialysat wird auf ein Volumen von 100 ml und eine Konzentration von 0,1 mmol/l Calciumacetat und 0,1 mol/l Natriumacetat eingestellt, mit Essigsäure auf pH 7

titriert, mit je 1 U Heparinase I, Heparinase II und Heparinase III versetzt und 15 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach Dialysieren gegen Wasser und Einengen unter Wasserstrahlvakuum wird die resultierende Lösung erneut auf eine Säule mit 10 ml DEAE Sephadex A50 der Firma Pharmacia Biotech. aufgetragen und wie oben beschrieben eluiert. Die DMMB-positiven Gradientenfraktionen werden dialysiert, unter Wasserstrahlvakuum auf ein Volumen von 1 ml eingengt und auf einer Säule zur präparativen Gelfiltration (60 cm x 2 cm) unter Verwendung eines Sepharose Cl-4B Gels der Firma Pharmacia Biotech. chromatographiert. Es werden 60 Fraktionen zu je 2 ml Volumen gesammelt, mit DMMB detektiert und die positiven Fraktionen vereinigt. Nach wiederholter Dialyse und Lyophilisation erhält man das aufgereinigte Leukocytenoberflächen-Proteochondroitinsulfat.

3.) Isolierung von Heparansulfat/Chondroitinsulfat-Gemisch aus Omentum:

Ein Kilogramm frisches Rinderomentum wird mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen, gefriergetrocknet, gemahlen und mit 1 Liter Aceton durch Rühren über Nacht bei Raumtemperatur entfettet. Nach dem Abfiltrieren und Trocknen wird das resultierende Pulver in 6 molarer Harnstoff-Lösung suspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zentrifugation bei 3000 g für 1 Stunde wird der schleimige Überstand abgegossen, auf 4°C gekühlt, mit dem gleichen Volumen 4°C kalter 1 molarer NaOH gemischt und 15 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wird mit verdünnter HCl neutralisiert, gegen Wasser dialysiert, 1 Stunde bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Im Überstand werden 100 ml DEAE-Sepharose CL-6B Ionenaustauscher-Gel der Firma Pharmacia Biotech. suspendiert und sedimentiert. Das so beladene Gel wird noch dreimal in 0,1 molarer Kochsalz-Lösung gewaschen und in eine Chromatographiesäule gefüllt. Mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0,1 bis 0,8 mol/l über einem Gesamt-Elutionsvolumen von 2 Litern wird die Säule eluiert. Es werden 200 Fraktionen zu je 10 ml Volumen gesammelt und die Fraktionen, die mit Dimethylmethylblau (DMMB) eine positive Farbreaktion ergeben, vereinigt. Die Lösung wird bei 26,7 hPa (20 Torr) und 40°C eingengt und gegen Wasser dialysiert. Unter Wasserstrahlvakuum wird erneut auf ein Volumen von 5 ml eingengt und auf einer Säule zur präparativen Gelfiltration

(60 cm x 5 cm) unter Verwendung eines Sephacryl S-300 Gels der Firma Pharmacia Biotech. chromatographiert. Es werden 60 Fraktionen zu je 10 ml Volumen gesammelt, mit DMMB detektiert und die positiven Fraktionen vereinigt. Nach wiederholter Dialyse und Lyophilisation erhält man das aufgereinigte Mesothelzelloberflächen-Glykosaminoglykan-Gemisch.

4.) Isolierung von Mesothelzelloberflächen Chondroitinsulfat aus mesothelzellreichen Geweben:

Ein Kilogramm frische Rindernieren wird mit 0,9%iger NaCl-Lösung gewaschen, gefriergetrocknet, gemahlen und mit 1 Liter Aceton durch Rühren über Nacht bei Raumtemperatur entfettet. Nach dem Abfiltrieren und Trocknen wird das resultierende Pulver in 4 molarer Guanidiniumchlorid-Lösung suspendiert und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Nach Zentrifugation bei 3000 g für 1 Stunde wird der schleimige Überstand abgegossen, auf 4°C gekühlt, mit dem gleichen Volumen 4°C kalter 1 molarer NaOH gemischt und 15 Stunden bei 4°C inkubiert. Danach wird mit verdünnter HCl neutralisiert, gegen Wasser dialysiert, 1 Stunde bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand dekantiert.

Im Überstand werden 100 ml DEAE-Sephacel Ionenaustauscher-Gel suspendiert und sedimentiert. Das so beladene Gel wird noch dreimal in 0,1 molarer Kochsalz-Lösung gewaschen und in eine Chromatographiesäule gefüllt. Mit einem linearen Kochsalzgradienten von 0,1 bis 0,8 mol/l über einem Gesamt-Elutionsvolumen von 2 l wird die Säule eluiert. Es werden 200 Fraktionen zu je 10 ml Volumen gesammelt und die Fraktionen, die mit DMMB eine positive Farbreaktion ergeben, vereinigt. Die Lösung wird bei 26,7 hPa (20 Torr) und 40°C eingeeengt und gegen Wasser dialysiert. Das Dialysat wird auf ein Volumen von 100 ml und eine Konzentration von 0,1 mmol/l Calciumacetat und 0,1 mol/l Natriumacetat eingestellt, mit Essigsäure auf pH 7 titriert, mit je 1 U Heparinase I, Heparinase II und Heparinase III versetzt und 15 Stunden bei 37°C inkubiert.

Nach Dialysieren gegen Wasser und Einengen unter Wasserstrahlvakuum wird die resultierende Lösung erneut auf eine Säule mit 10 ml DEAE-Sephacel aufgetragen und wie oben beschrieben eluiert. Die DMMB-positiven Gradientenfraktionen werden analysiert, unter Wasserstrahlvakuum auf ein Volumen von 1 ml eingeeengt und auf

einer Säule zur präparativen Gelfiltration (60 cm x 5 cm) unter Verwendung eines Sephacryl S-300 Gels chromatographiert. Es werden 60 Fraktionen zu je 10 ml Volumen gesammelt, mit DMMB detektiert und die positiven Fraktionen vereinigt. Nach wiederholter Dialyse und Lyophilisation erhält man das aufgereinigte Mesothelzelloberflächen-Chondroitinsulfat.

5.) Immobilisierung von Mesothelzelloberflächen Chondroitinsulfat mit (N-Cyclohexyl-N'-2-morpholinoethyl)carbodiimidmethyl p-Toluolsulfonat (CME-CDI) auf funktionalisierte Zelluloseoberflächen:

100 mg Zellulosemembran werden in eine 2 prozentige Lösung von 3-Aminopropyltriethoxysilan in Ethanol/Wasser (50:50) gegeben und 24 Stunden bei 45°C gerührt. Danach werden die Membranen mit viel Wasser gewaschen und getrocknet. Die so behandelten Membranen werden in eine Lösung von 1 mg Mesothelzelloberflächen Chondroitinsulfat in 80 ml 0,1 molarer 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer pH 4,75 getaucht. Über einen Zeitraum von 6 Stunden werden bei 4°C 200 mg (N-Cyclohexyl-N'-2-morpholinoethyl)carbodiimidmethyl p-Toluolsulfonat (CME-CDI) der Firma Sigma in 10 mg Portionen zugegeben und über Nacht bei 4°C weitergerührt. Danach wird 2 Stunden in 4 molarer NaCl-Lösung gerührt, mit viel Wasser gespült und an der Luft getrocknet.

CNCI Immobilisierung von Sphingoglycolipid auf Glas:

Ein Glas, beispielsweise ein Deckgläschen für die Mikroskopie, wird 6 Stunden in 5 ml Chromschwefelsäure gerührt. Dann wird mit viel Wasser gewaschen, luftgetrocknet und in 15 ml Dioxan auf 50°C erhitzt. Anschließend werden 2,5 ml einer 2 molaren N,N'-Diisopropylethylamin-Lösung in Dioxan zugegeben und 30 min gerührt. Dann werden 2,5 ml einer 1 molaren CNCI-Lösung in Dioxan zugeführt und für weitere 2 Stunden gerührt. Anschließend wird zuerst mit Dioxan gewaschen, dann mit Dioxan/Wasser und schließlich mit reinem Wasser gewaschen. Das so modifizierte Glas wird in 20 ml einer Lösung aus 1 mol/l Ethylendiamin und 0,1 mol/l NaHCO₃ gegeben, dann auf 50°C erwärmt und 72 Stunden bei dieser Temperatur

gerührt. Anschließend werden 0,1 mg Sphingoglycolipid aus humanen Erythrocyten in 20 ml 0,1 molarer NaHCO_3 gelöst und zusammen mit dem substituierten Glas 110 Stunden bei 60°C gerührt. Dann werden 2,5 ml Ethanolamin hinzu gegeben und weitere 30 Minuten gerührt. Das beschichtete Glas wird mit 4 molarer NaCl -Lösung und anschließend mit viel Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet.

7.) Immobilisierung von Erythrozytenplasmamembran-Heparansulfat auf die Oxidschicht von Nickel, Titan, Aluminium oder ähnlichen Metallen:

Das Metallwerkstück wird vier Stunden im Ultraschallbad mit heißem Wasser gereinigt, mit Aceton gewaschen und eine Stunde in einem Soxhlet-Extraktor mit Chloroform entfettet. Das so gereinigte Werkstück wird getrocknet und 2-15 min unter Rühren in eine 0,01 -0,1 molare Lösung von ω -Hexadecenyltrichlorsilan in Bicyclohexyl getaucht, zweimal mit Chloroform und Wasser gewaschen und 15 min im Soxhlet-Extraktor mit Chloroform extrahiert. Das Werkstück wird bei 0°C 45 min in eine Lösung von 2 ml Aceton und 100 mg KMnO_4 in 18 ml Wasser getaucht und durch die einen CO_2 -Strom geleitet. Danach wird es für 15 Sekunden in eine 20%ige Lösung von Natriumbisulfit in Wasser getaucht, mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Das Werkstück wird über Nacht in einer Lösung von 29,25 g Paratoluylsulfonylchlorid in 900 ml Aceton und 180 ml Pyridin bei 40°C gerührt. Anschließend wird das Werkstück mit Wasser und Methanol gewaschen und 40 Stunden lang bei 60°C in einer Lösung von 1 mmol/l Diaminododekan in 1 Liter Dimethylformamid gerührt. Danach wird das Werkstück sukzessive mit Wasser, 1 mol/l Sodalösung, 1 mmol/l Salzsäure und Wasser gewaschen. Das so vorbereitete Werkstück wird für 90 Minuten in einer Borat-Pufferlösung (Natriumtetraborat 0,065 mol/l, pH 9,5) gerührt. Schließlich wird in einer Lösung aus 0,3 g 4-Azido-1-Fluoro-2-Nitrobenzol in einem Liter Ethanol über Nacht bei 37°C gerührt. 0,5 g Erythrozytenplasmamembran-Heparansulfat werden in einem Liter 0,1 molaren 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-(MES)-Puffer pH 4,75 gelöst und mit dem Werkstück bei 4°C für 48 Stunden gerührt. Das Erythrozytenplasmamembran-Heparansulfat wird kovalent immobilisiert 10 minütige Belichtung mit einer Hochdruck-Quecksilberlampe. Nach Waschen mit 4

molarer Kochsalzlösung für 40 Minuten wird das Werkstück mit Wasser gewaschen und anschließend getrocknet.

8.) Photochemische Immobilisierung von Leukozytenplasmamembran-Chondroitinsulfat auf Zellulose:

3 g Zellulosemembran werden in 4 molarer NaOH 2 Stunden quellen gelassen, dreimal mit Wasser gewaschen, einmal mit Wasser/Aceton und einmal mit Aceton gewaschen. Die so aktivierte Zellulose wird über Nacht in einer Lösung von 29,25 g Paratoluylsulfonylchlorid in 900 ml Aceton und 180 ml Pyridin bei 40°C gerührt. Anschließend wird die Zellulosemembran mit Wasser und Methanol gewaschen. Die resultierende veresterte Zellulosemembran wird nun über 40 Stunden bei 60°C in einer Lösung von 1 mmol/l Diaminododekan in 1 Liter Dimethylformamid gerührt. Danach wird die Membran sukzessive mit Wasser, 1 mol/l Sodalösung, 1 mmol/l Salzsäure und Wasser gewaschen. Die so erhaltene Aminozellulose wird für 90 Minuten in einer Borat-Pufferlösung (Natriumtetraborat 0,065 molar, pH 9,5) gerührt. Schließlich wird die Membran in einer Lösung aus 0,3 g 4-Azido-1-Fluoro-2-Nitrobenzol in einem Liter Ethanol über Nacht bei 37°C gerührt. 0,5 g Leukozytenoberflächen-Chondroitinsulfat werden in einem Liter 0,1 molaren 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer pH 4,75 gelöst und mit 2,5 g der wie oben beschrieben hergestellten Azido-Zellulose bei 4°C für 48 Stunden gerührt. Das Leukozytenoberflächen-Chondroitinsulfat wird kovalent immobilisiert durch 10 minütige Belichtung mit einer Hochdruck-Quecksilberlampe. Nach Waschen mit 4 molarer Kochsalzlösung für 40 Minuten und Wasser wird die Zellulosemembran getrocknet.

9.) Immobilisierung von Glycophorin A mit Glutardialdehyd auf Silikon:

1 g Silikonfolie wird mit 20 ml Wasser und 2 ml 3-Aminopropyltriethoxysilan versetzt und der pH-Wert auf 3,5 eingestellt. Dann wird für 2 Stunden auf 75°C erhitzt, mit Wasser gewaschen und getrocknet. Das so erhaltene Aminogruppen-haltige Silikon wird mit einer 2,5 prozentigen Lösung von Glutardialdehyd in 0,05 molarem

Natriumphosphatpuffer versetzt und auf pH 7 eingestellt. Nach 60 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wird das so hergestellte aktivierte Silikon mit einer 0,1%igen Lösung von Glycophorin A (Sigma) unter Rühren 2-4 Stunden umgesetzt und mit Wasser gewaschen.

10.) Immobilisierung von Erythrocytenplasmamembran-Heparansulfat auf Polyvinylchlorid (PVC):

0,5 g Eisen-II-sulfat, 100 µl konzentrierte Schwefelsäure und 2 ml Methacrylsäure werden in 250 ml Wasser gelöst. Zu dieser Lösung werden 125 mg Natriumdisulfit sowie 125 mg Kaliumperoxodisulfat zugegeben. Anschließend wird diese Lösung zwei Stunden bei Raumtemperatur durch einen ringförmigen 1 m langen PVC-Schlauch von 3 mm Innendurchmesser gepumpt. Die dabei ablaufende Tropfpolymerisation wird durch Zugabe von 100 mg Hydrochinon abgebrochen. Dann wird der Schlauch gründlich mit Wasser gewaschen. Eine auf 4°C gekühlte Lösung von 250 mg CME-CDI (N-Cyclohexyl-N'-2-morpholinoethyl)carbodiimidmethyl p-Toluolsulfonat in 250 ml 0,1 molarem 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer pH 4,75 wird bei 4°C 30 min im Kreis durch den Schlauch gepumpt. Der so aktivierte Schlauch wird mit 0,1 molarem 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer pH 4,75 gewaschen. Dann wird eine Lösung von 1 mg Erythrozytenplasmamembran-Heparansulfat in 0,1 molarem 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure-Puffer pH 4,75 bei 4°C 15 Stunden lang im Kreis durch den Schlauch gepumpt. Abschließend wird der Schlauch mit 4 molarer Kochsalzlösung und dann mit Wasser gespült.

Patentansprüche:

1. Hämkompatible Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, daß auf/in die Oberfläche von Werkstoffen Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen, Mesothelzellen und/oder mesothelzellreichem Gewebe auf- bzw. eingebracht sind.
2. Hämkompatible Oberflächen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie nicht-thrombogen und/oder nicht-immunogen sind.
3. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie Glykoproteine enthalten.
4. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Glykoproteine Glykophorine, bevorzugt Glykophorin A enthalten.
5. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß sie Oligo- bzw. Polysaccharid- und/oder Lipid-Anteile der Glykoproteine, Glykolipide oder Proteoglykane der äußeren Zellschicht enthalten.
6. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Glykolipide Glykosphingolipide enthalten.
7. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Oligo- bzw. Polysaccharid-Anteile der Proteoglykane Hyaluronsäuren, Chondroitinsulfate, Dermatansulfate, Heparansulfate, Keratansulfate oder Mischungen davon enthalten.
8. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß sie Heparansulfat der Erythrocyten-Plasmamembran tierischer und/oder menschlicher Herkunft enthalten.

9. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Werkstoffe künstliche oder natürliche Polymere oder Mischungen davon (Polymerblends) enthalten.
10. Hämkompatible Oberflächen nach einem der Ansprüche 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Werkstoffe makromolekulare Substanzen, anorganische Substrate, bevorzugt Metalle, Metalloxide, Legierungen, Keramiken, Gläser, Mineralien oder Mischungen davon, und/oder Materialien, die mit Blut oder anderen Körperflüssigkeiten in Verbindung kommen, oder Kombinationen davon enthalten.
11. Verfahren zur Herstellung hämkompatibler Oberflächen, dadurch gekennzeichnet, daß Bestandteile aus der äußeren Schicht von Blutzellen, Mesothelzellen und/oder mesothelzellreichem Gewebe isoliert und auf/in die Oberfläche von Werkstoffen auf- bzw. eingebracht werden.
12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß zur Gewinnung der Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen Vollblut oder aus Vollblut gewonnene Zellfraktionen menschlicher oder tierischer Herkunft verwendet werden.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß als Blutzellen Erythrocyten, Leukocyten oder Thrombocyten verwendet werden.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-13, dadurch gekennzeichnet, daß als Blutzellen besonders bevorzugt Erythrocyten verwendet werden.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-14, dadurch gekennzeichnet, daß als mesothelzellreiche Gewebe Omentum, Peritoneum oder innere Organe verwendet werden.
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-15, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestandteile der äußeren Zellschichten chemisch oder physikalisch auf/in die Oberfläche von Werkstoffen auf- bzw. eingebracht werden.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-16, dadurch gekennzeichnet, daß zur Auf- bzw. Einbringung der Bestandteile der äußeren Zellschicht auf/in die Oberfläche von Werkstoffen bevorzugt eine Immobilisierung, Photoimmobilisierung, Kupplung, Adhäsion, Trocknung oder eine Kombination davon durchgeführt wird.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11-17, dadurch gekennzeichnet, daß zur Auf- bzw. Einbringung der Bestandteile der äußeren Zellschicht auf/in die Oberfläche von Werkstoffen kovalente, ionische, nebenvalente bzw. elektrostatische oder adhäsive Bindungen oder Kombinationen davon, besonders bevorzugt kovalente Bindungen, ausgebildet werden.
19. Verwendung hämokompatibler Oberflächen gemäß einem der Ansprüche 1-10 in weiten Bereichen des Gesundheitssektors, in der Medizin, Zahnmedizin, Chirurgie oder Kosmetik und/oder in Bereichen, die mit Blut, Gewebe und/oder anderen Körperflüssigkeiten in Verbindung kommen.

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft hämokompatible Oberflächen, die sich dadurch auszeichnen, daß auf/in die Oberfläche von Werkstoffen Bestandteile der äußeren Schicht von Blutzellen, Mesothelzellen und/oder mesothelzellreichem Gewebe auf- bzw. eingebracht sind. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung hämokompatibler Oberflächen sowie deren Verwendung in weiten Bereichen des Gesundheitssektors, in der Medizin, Zahnmedizin, Chirurgie, Kosmetik oder in Bereichen, die direkt mit Blut, Gewebe oder anderen Körperflüssigkeiten in Kontakt stehen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)